

⑩ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭56—35992

⑬ Int. Cl.³
C 12 P 13/12
// (C 12 P 13/12
C 12 R 1/185)

識別記号

庁内整理番号

6712—4B

⑭ 公開 昭和56年(1981)4月8日

発明の数 1
審査請求 未請求

6760—4B

(全 3 頁)

⑮ 発酵法による L-メチオニンの製造法

⑯ 発明者 中森茂

横浜市金沢区釜利谷町2153—18
7

⑰ 特 願 昭54—109815

⑱ 出 願 昭54(1979)8月29日

⑲ 出 願 人 味の素株式会社

⑳ 発 明 者 土田隆康

東京都中央区京橋1丁目5番8
号

川崎市幸区鹿島田958

明 細 書

1. 発明の名称

発酵法による L-メチオニンの製造法

2. 特許請求の範囲

エンエリヒア属に属し、リジンアナログ、フェニールアラニンアナログ又はヒスチジンアナログに耐性を有する微生物を培養し、培地中に L-メチオニンを生成蓄積せしめ、これを採取することとを特徴とする発酵法による L-メチオニンの製造法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、発酵法による L-メチオニンの製造法に関する。

従来、発酵法による L-メチオニンの製造法としては、エンエリヒア属、サツカロミセス属、キヤンディダ属、ストレプトミセス属等広範囲の微生物が少量の L-メチオニンを生産することが知

られている。

これに対し、本発明者らは、エンエリヒア属の微生物から突然変異によつてリジンアナログ耐性株、フェニールアラニンアナログ耐性株又はヒスチジンアナログ耐性株を育種することにより、少量の L-メチオニンを生産する能力を有する菌株を得た。我々はこの知見に基づいて本発明を完成させた。

本発明でいうリジンアナログとは、エンエリヒア属の微生物の生育を抑制するが、その抑制は L-リジンによつて部分的又は全体的に解除されるような物質をいい、例えば、S-(2-アミノエチル)-システイン(以下 AEC と略す)、アザリジン、オキサリジン、トランス-4-デヒドロリジン、3-アミノエチルシクロヘキサングリン、リジンヒドロキサム酸、3-アミノシクロヘキサアラニン、2,6-ジアミノヘプタン酸、 α -アミノ- ϵ -ヒドロキシカブロン酸がある。

又、本発明でいうフェニールアラニンアナログとは、エンエリヒア属の微生物の生育を抑制する

が、その抑制は L- ~~フェニルアラニン~~ によつて部分的又は全体的に解除されるような物質をいう。例えば、 ρ -フルオロフェニルアラニン（以下 FPA と略す）、 o -フルオロフェニルアラニン、 m -フルオロフェニルアラニン、 o -、 m -又は p -アミノフェニルアラニン、 β -フェニルセリン、シクロヘキシルアラニン、 α -アミノ- β -フェニルエタンスルホン酸、 o -、 m -又は p -ブロモフェニルアラニン、 β -2-チフェニルアラニン、 β -3-チフェニルアラニン、 β -2-フリルアラニン、 β -2-ピロールアラニン、1-シクロペンテン-1-アラニン、1-シクロヘキセン-1-アラニン、2-アミノ-4-メチル-4-ヘキセン酸、S-（1,2-ジクロロピニル）-システイン、 β -4-ピリジールアラニン、 β -2-ピリジールアラニン、 β -4-ピラゾールアラニン、 p -ニトロフェニルアラニン等をいう。更に本発明でいうヒスチジンアナログとは、2-チアゾールアラニン（以下 2-TA と略す）、1,2,4-オトリアゾールアラニン等の ~~のフェニルアラニンの抑制~~ の増進と抑制との γ -抑制は L- ヒスチジンに解除されるものという。 - 3 -

0.04 g/dl、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 mg/dl、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1 mg/dl、チアミン・塩酸塩 1 mg/ml を含む。

表 1 才

AEC-HC I (r/ae)	相 对 生 育 度	
	K-12	AJ 11457
0	100	100
100	85	100
250	70	98
500	30	90
1000	10	90
3000	0	10

本発明の方法において用いられる微生物としては具体的には、以下のものがある。

エシエリヒア・コリ AJ11457 (FERM-P 5/75)

エシエリヒア・コリ AJ11458 (FERM-P 5/26)

エシエリヒア・コリ AJ 11459 (FERM-P 5177)

これらの菌株は、エシエリヒア・コリ K-12 (ATCC 10798) から変異誘導したものであり、エシエリヒア・コリ AJ11457 は AEC に耐性を有し、エシエリヒア・コリ AJ11458 は FPA に耐性を有し、エシエリヒア・コリ AJ11459 は 2-TA に耐性を有する菌株である。

これらの菌株のAEC、FPA、2-TAに対する耐性度をオ1表～オ3表に示す。これらの結果は、下記組成の培地にAEC・HCl、FPA又は2-TAを表に示した濃度になるように溶解し、各菌株を接種したのち、31℃で24時間培養を行い、菌の生育を調べたものである。

培地組成：グルコース 0.5 g/dl、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1 g/dl、 KH_2PO_4 0.846 g/dl、クエン酸ナトリウム 0.05 g/dl、 KOH 0.226 g/dl、 $\text{MgSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

表 2 才

F P A (r/ne)	相 对 生 育 值	
	K - 1 2	A J 1 1 4 5 8
0	1 0 0	1 0 0
5 0	1 0 0	1 0 0
1 0 0	8 0	1 0 0
2 0 0	6 5	9 8
5 0 0	1 0	7 0
1 0 0 0	0	3 0

表 3 才

2 - T A (Y / ml)	相 对 生 育 值	
	K - 1 2	A J 1 1 4 5 9
0	1 0 0	1 0 0
2 0 0	4 0	1 0 0
5 0 0	2 0	9 8
7 5 0	1 2	9 8
1 0 0 0	0	9 5
2 0 0 0	0	8 0

本発明でいう薬剤耐性とは、上記培養条件下において、薬剤が存在するときの比生育度が親株であるエシエリヒア・コリ K-12 よりも大である場合をいう。又、比生育度は、薬剤が無添加のときの菌の生育量（接種菌量を差し引いた量）を100とした。生育は570nmの吸光度で測定した。

L-メチオニンを生産するための培養培地は特定のものであることを要せず、炭素源、窒素源、無機塩及び必要ならば有機微量栄養素を含有する通常の培地が用いられる。炭素源として炭水化物（グルコース、シスクロース、フラクトース、ラクトース及びこれらを含有するデンプンやセルロース等の加水分解物、糖蜜、ホエイ等）、有機酸（酢酸、クエン酸等）、アルコール（グリセリン、エタノール、メタノール等）が使用できる。窒素源としては、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、リン酸アンモニウム、塩化アンモニウム等のアンモニウム塩、アンモニアガス、アンモニア水等が好ましい。無機塩としてはリン酸塩、マグネ

シウム塩、カルシウム塩、鉄塩、マンガン塩、その他微量金属塩等を必要に応じて使用する。有機微量栄養素としては、栄養要求性のある場合には、該当するアミノ酸、ビタミン、脂肪酸類、有機塩基物質等を至適量添加し、必要に応じて更に生育促進物質としてアミノ酸、ビタミン、酵母エキス、ペプトン、カザミノ酸等を使用する。

培養条件は好氣的条件下に行うのがよく、pH 5ないし9、温度20℃ないし45℃にて行えばより好ましい結果が得られる。培養中にpHが下るときには、アンモニア水、アンモニアガス等のアルカリで中和する。pHが上るときには、酢酸又は有機酸を炭素源とする場合は有機酸を添加する。

実施例1

グルコース 5 g/dl、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.5 g/dl、
 KH_2PO_4 0.2 g/dl、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g/dl、
 酵母エキス 0.05 g/dl、サイアミン塩酸塩 1000
 r/l、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 mg/dl、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1

- 7 -

- 8 -

mg/dl、炭酸カルシウム 2.5 g/dlの組成をもち、
 pH 7.0の水溶液培地を500 mlフラスコに20
 ml分注し、これに各菌株を1白金耳植えつけ、31
 ℃で72時間培養した。発酵終了時におけるL-
 メチオニンの蓄積量は表4の如くであった。

表 4

菌 株	L-メチオニン蓄積量 (mg/dl)
AJ 11457	120
AJ 11458	116
AJ 11459	50

特許出願人 味の素株式会社